

RECORD COPY

1/4

PCT REQUEST

2990043PC/nu

Original (for SUBMISSION) - printed on 06.07.2000 01:51:22 PM

0 0-1	For receiving Office use only International Application No.	PCT/FI 00 / 00624
0-2	International Filing Date	06 JUL 2000 (06-07-2000)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	The Finnish Patent Office PCT International Application
0-4 0-4-1	Form - PCT/RO/101 PCT Request Prepared using	PCT-EASY Version 2.90 (updated 10.05.2000)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	National Board of Patents and Registration (Finland) (RO/FI)
0-7	Applicant's or agent's file reference	2990043PC/nu
I	Title of invention	METHOD OF PURIFYING WATER, SUITABLE BACTERIA FOR THE METHOD AND USE THEREOF
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	JUEGROUP OY
II-5	Address:	Pahtajakuja 7 FIN-96400 Rovaniemi Finland
II-6	State of nationality	FI
II-7	State of residence	FI
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	UOTILA, Jussi
III-1-5	Address:	Kuusamontie 1176 FIN-96900 Saarenkylä Finland
III-1-6	State of nationality	FI
III-1-7	State of residence	FI

PCT REQUEST

2990043PC/nu

Original (for SUBMISSION) - printed on 06.07.2000 01:51:22 PM

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	ZAITSEV, Gennadi
III-2-5	Address:	Sudentie 27 B 14 FIN-96500 Rovaniemi Finland
III-2-6	State of nationality	BY
III-2-7	State of residence	FI
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name	KOLSTER OY AB
IV-1-2	Address:	Iso Roobertinkatu 23 P.O. Box 148 FIN-00121 Helsinki Finland
IV-1-3	Telephone No.	358 9 618 821
IV-1-4	Facsimile No.	358 9 602 244
IV-1-5	e-mail	kolster@kolster.fi
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT

PCT REQUEST

2990043PC/nu


Original (for SUBMISSION) - printed on 06.07.2000 01:51:22 PM

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT (patent and utility model) AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CR CU CZ (patent and utility model) DE (patent and utility model) DK (patent and utility model) DM DZ EE (patent and utility model) ES FI (patent and utility model) GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR (patent and utility model) KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK (patent and utility model) SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW	
V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	12 July 1999 (12.07.1999)	
VI-1-2	Number	991595	
VI-1-3	Country	FI	
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	4	-
VIII-2	Description	21	-
VIII-3	Claims	2	-
VIII-4	Abstract	1	2990043p.txt
VIII-5	Drawings	10	-
VIII-7	TOTAL	38	

PCT REQUEST

2990043PC/nu

Original (for SUBMISSION) - printed on 06.07.2000 01:51:22 PM

	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-14	Separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	✓	-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-17	Other (specified):	Copy of Official Action	-
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract	-	
VIII-19	Language of filing of the international application	Finnish	
IX-1	Signature of applicant or agent	 Tapio Åkräs	
IX-1-1	Name	KOLSTER OY AB	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	06 JUL 2000	(06-07-2000)
10-2	Drawings:		
10-2-1	Received		
10-2-2	Not received		
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application		
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)		
10-5	International Searching Authority	ISA/EP	
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid		

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	14 AUGUST 2000	(14.08.00)
------	--	----------------	------------

1/10

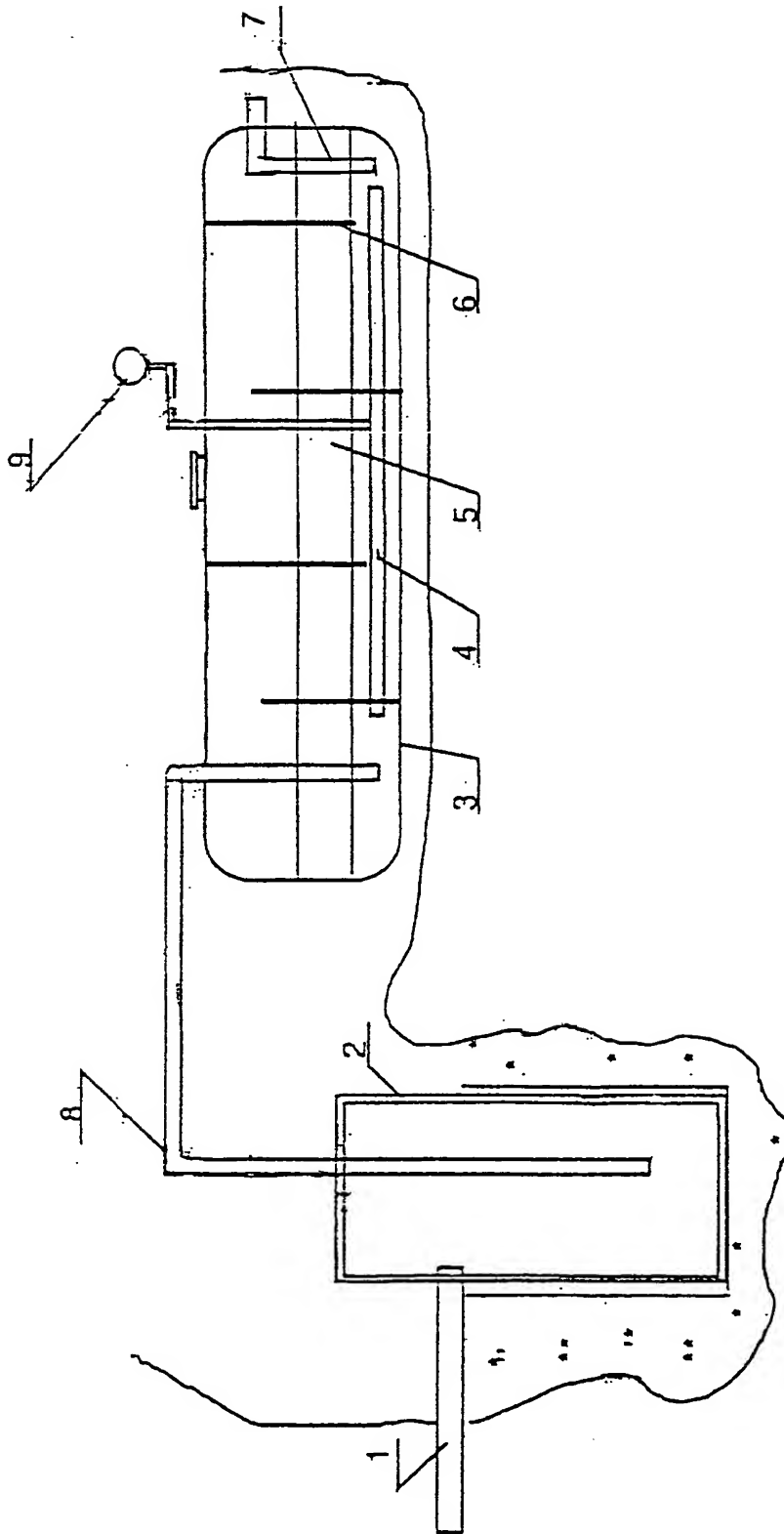


Fig. 1

2/10

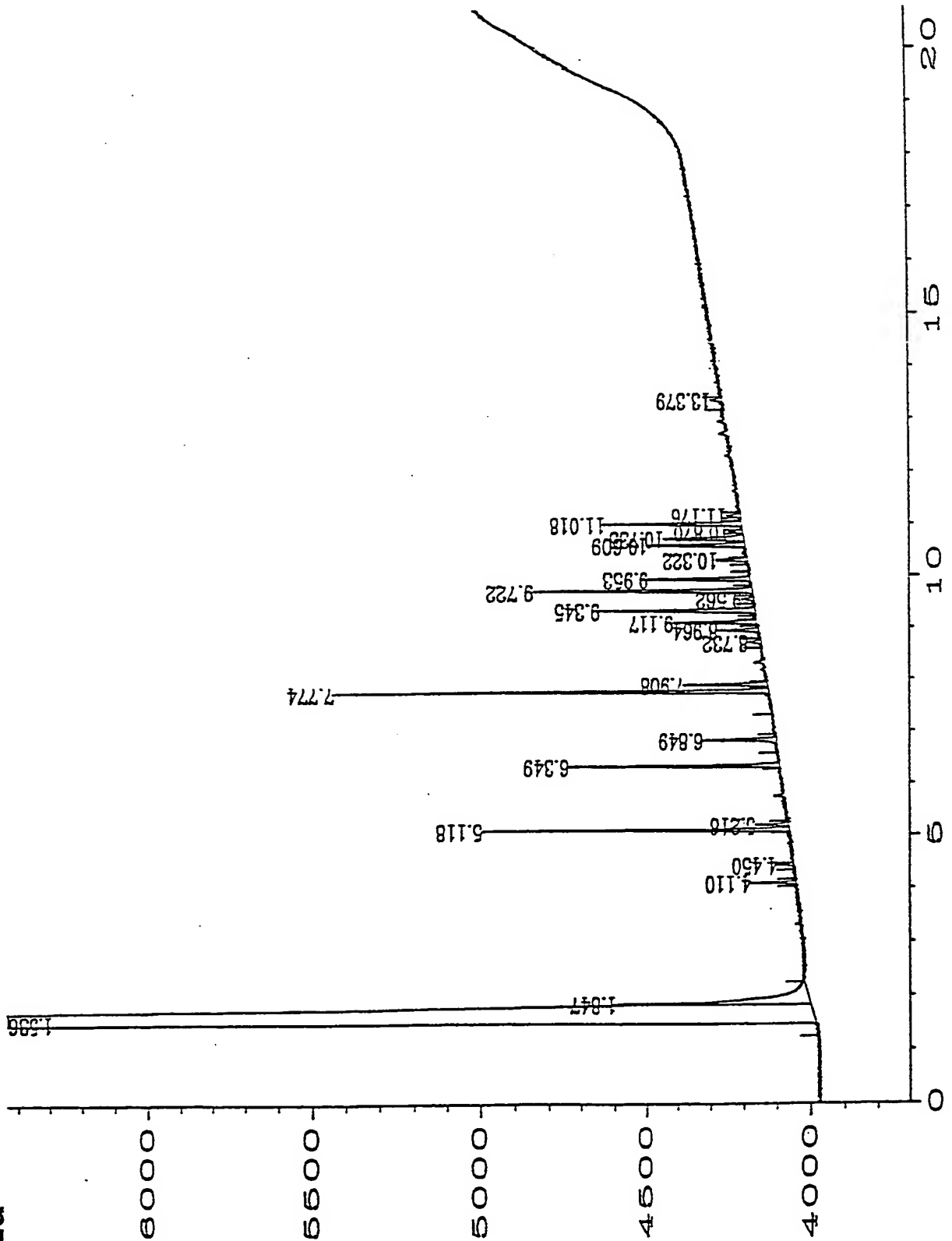


Fig. 2a

Fig. 2b

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	#	Comment 1	Comment 2
1.536	308581200	0.027	. . .	7.025	SOLVENT PEAK	. . .	< min rt	
1.847	17778	0.083	. . .	7.687	< min rt	
4.110	1440	0.028	1.084	11.607	12:0 ISO	. . .	ECL deviates -0.001	Reference 0.003
4.450	606	0.031	1.069	12.000	12:0	. . .	ECL deviates -0.000	Reference 0.004
5.118	10566	0.030	1.047	12.612	13:0 ISO	. . .	ECL deviates 0.000	Reference 0.003
5.216	1182	0.033	1.044	12.702	13:0 ANTEISO	. . .	ECL deviates 0.001	Reference 0.004
6.349	8064	0.033	1.014	13.618	14:0 ISO	. . .	ECL deviates -0.000	Reference 0.002
6.849	3396	0.039	1.003	14.000	14:0	. . .	ECL deviates -0.000	Reference 0.002
7.774	18384	0.037	0.986	14.622	15:0 ISO	. . .	ECL deviates 0.001	Reference 0.003
7.908	3624	0.038	0.984	14.712	15:0 ANTEISO	. . .	ECL deviates 0.001	Reference 0.003
8.732	684	0.042	. . .	15.245		
8.964	1980	0.040	0.968	15.388	16:1 w/c alcohol	. . .	ECL deviates 0.002	
9.117	3660	0.038	0.965	15.483	Sum In Feature 3	. . .	ECL deviates 0.001	16:1 ISO I/14:0 30
9.345	8022	0.044	0.962	15.624	16:0 ISO	. . .	ECL deviates -0.002	Reference -0.001
9.562	582	0.039	0.959	15.758	16:1 w/c	. . .	ECL deviates 0.001	
9.722	10494	0.040	0.957	15.857	Sum In Feature 4	. . .	ECL deviates 0.010	15:0 ISO 20H/16:1w
9.953	4800	0.040	0.954	15.999	16:0	. . .	ECL deviates -0.001	Reference 0.001
10.322	1500	0.038	0.950	16.218	15:0 20H	. . .	ECL deviates 0.001	
10.609	4914	0.041	0.946	16.387	ISO 17:1 w/c	. . .	ECL deviates 0.000	
10.735	4188	0.043	0.945	16.462	ISO 17:1 w/c	. . .	ECL deviates 0.001	
10.870	660	0.035	0.943	16.541	17:1 ANTEISO A	. . .	ECL deviates 0.000	
11.018	6588	0.040	0.941	16.629	17:0 ISO	. . .	ECL deviates -0.000	Reference 0.002
11.176	780	0.040	0.940	16.722	17:0 ANTEISO	. . .	ECL deviates 0.000	Reference 0.002
13.379	624	0.044	0.918	18.001	18:0	. . .	ECL deviates 0.001	Reference 0.003
*****	3660	SUMMED FEATURE 3	. . .	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
*****	16:1 ISO I/14:0 30H	14:0 30H/16:1 ISO
*****	10494	SUMMED FEATURE 4	. . .	16:1 w/c/15 iso 20H	15:0 ISO 20H/16:1w
Solvent Ar. Total Area Named Area # Named Total Amnt Nbr Ref ECL Deviation Ref ECL Shift								
308581200	96738	96054	99.29	94302	13		0.002	0.003
TSHA [Rev 3.90] Bacillus 0.265 (Bacillus cereus group)								
B. thuringiensis 0.265 (Bacillus cereus group)								
B. cereus 0.160								
CLIN [Rev 3.90] * NO MATCH *								

4/10

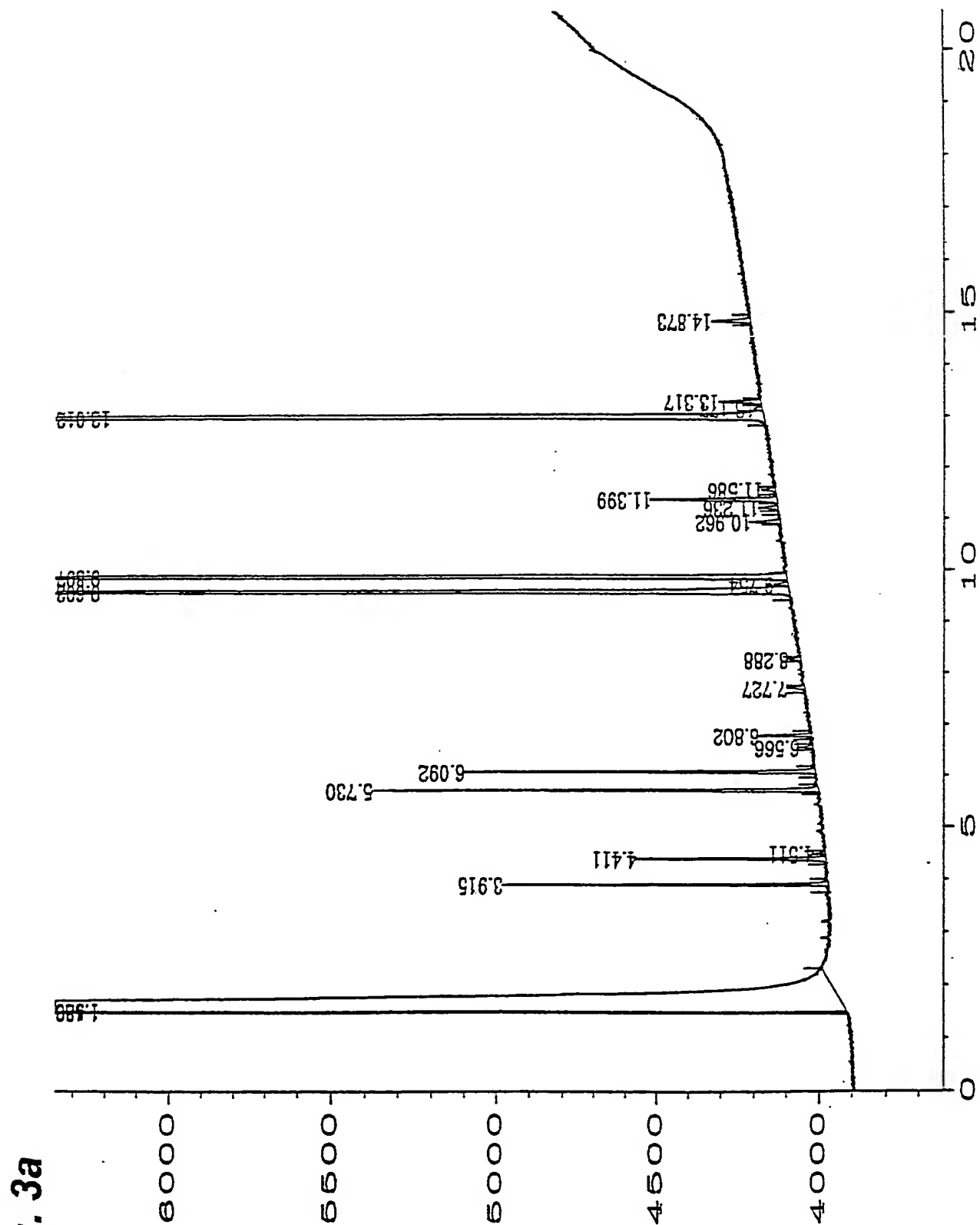


Fig. 3a

Fig. 3b

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	Δ	Comment 1	Comment 2
1.489	150156	0.015	. . .	6.962	< min rt	
1.520	274442400	0.026	. . .	7.029	SOLVENT PEAK	. . .	< min rt	
3.915	10338	0.027	1.094	11.422	10:0 30H	. . .	ECL deviates -0.001	
4.411	6870	0.030	1.071	11.999	12:0	2.95	ECL deviates -0.001	Reference 0.000
4.511	408	0.031	1.067	12.091	11:0 ISO 30H	. . .	ECL deviates 0.001	
5.730	16770	0.032	1.028	13.177	12:0 20H	0.11	ECL deviates -0.001	
6.092	14094	0.034	1.019	13.455	12:0 30H	4.50	ECL deviates -0.000	
6.566	558	0.035	. . .	13.818	. . .	3.75	ECL deviates -0.000	
6.802	2136	0.034	1.002	13.999	14:0	. . .	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
7.727	846	0.041	0.984	14.624	15:0 ISO	0.56	ECL deviates 0.003	Reference 0.002
8.288	630	0.045	0.974	15.002	15:0	0.22	ECL deviates 0.002	Reference 0.002
9.603	86670	0.040	0.953	15.816	Sum In Feature 4	0.16	ECL deviates -0.001	16:1 W7c/15.150 20H
9.754	720	0.037	0.953	15.909	16:1 W5c	21.61	ECL deviates 0.001	
9.897	85884	0.040	0.951	15.998	16:0	0.18	ECL deviates -0.002	Reference -0.002
10.962	1596	0.042	0.938	16.629	17:0 ISO	21.32	ECL deviates -0.000	Reference -0.001
11.236	984	0.043	0.935	16.791	17:1 W8c	0.39	ECL deviates -0.001	
11.399	6552	0.044	0.933	16.887	17:0 CYCLO	0.24	ECL deviates -0.001	
11.586	744	0.045	0.931	16.998	17:0	1.60	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
13.012	163326	0.045	0.918	17.624	Sum In Feature 7	0.18	ECL deviates -0.002	Reference -0.002
13.177	570	0.054	0.916	17.919	18:1 W9c	39.14	ECL deviates -0.001	18:1 W9c/W12t/W7c
13.317	2106	0.042	0.915	18.001	18:0	0.14	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
14.873	2220	0.046	0.904	18.901	19:0 CYCLO W8c	0.50	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
*****	86670	SUMMED FEATURE 4	0.52	ECL deviates 0.001	Reference 0.000
*****	163326	SUMMED FEATURE 7	21.61	16:1 W7c/15.150 20H	15:0 ISO 20H/16:1 W7c
*****	39.14	18:1 W7c/W9t/W12t	18:1 W9c/W12t/W7c
*****	18:1 W12t/W9t/W7c	
Solvent Ar Total Area Named Area Δ Named Total Amnt Nbr Ref ECL Deviation Ref ECL Shift								
274442400	404022	403464	99.86	382931	10	0.001	0.002	
TSBA [Rev 3.90] Pseudomonas								
							0.700	
							0.700	
							0.477	(Pseudomonas VE2)
							0.477	(Pseudomonas VE2)
							0.387	(Pseudomonas VE1)
							0.387	(Pseudomonas VE1)
							0.339	
							0.339	
							0.242	
							0.322	(Pseudomonas VE1")
							0.322	(Pseudomonas VE1")
							0.205	(Pseudomonas VE2)
							0.205	(Pseudomonas VE2)
CLIN [Rev 3.90] Pseudomonas								
							0.700	
							0.700	
							0.477	(Pseudomonas VE2)
							0.477	(Pseudomonas VE2)
							0.387	(Pseudomonas VE1)
							0.387	(Pseudomonas VE1)
							0.339	
							0.339	
							0.242	
							0.322	(Pseudomonas VE1")
							0.322	(Pseudomonas VE1")
							0.205	(Pseudomonas VE2)
							0.205	(Pseudomonas VE2)

6/10

Fig. 4

RT	Area	Ar/Ht Respon	KCL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.665	243677184	0.032	7.032	SOLVENT PEAK		< min rt	
1.946	536	0.030	7.563			< min rt	
10.502	1080	0.061	15.815	Sum In Feature 4	0.81	KCL deviates -0.002	16:1 w7c/15 iso 20H
10.814	9496	0.049	15.999	16:0	7.07	KCL deviates -0.001	Reference -0.001
11.924	6120	0.051	16.631	17:0 ISO	4.50	KCL deviates 0.002	Reference 0.002
13.653	3040	0.058	17.606				
14.043	119192	0.051	17.825	Sum In Feature 7	85.92	KCL deviates -0.000	18:1 w9c/w12t/w7c
14.354	2376	0.050	17.999	18:0	1.71	KCL deviates -0.001	Reference -0.001
14.498	4160	0.055	18.081				
14.615	2272	0.088	18.147				
*****	1080			SUMMED FEATURE 4	0.81	16:1 w7c/15 iso 20H	15:0 ISO 20H/16:1w7c
*****	119192			SUMMED FEATURE 7	85.92	18:1 w7c/w9t/w12t	18:1 w9c/w12t/w7c
*****						18:1 w12t/w9t/w7c	
Solvent Ar Total Area Named Area % Named Total Amnt Nbr Ref KCL Deviation Ref KCL Shift							
243677184	147736	138264	93.59	127054	3	0.001	0.001
TSBA [Rev 3.90] Paracoccus							
						0.335	
						0.335	
						0.313 (4D, Rhiz X medium)	
						0.313 (4D, Rhiz X medium)	
						0.313 (4D, Rhiz X medium)	
						0.295 (48h, Pseudomonas mesophilica)	
						0.295 (48h, Pseudomonas mesophilica)	
						0.248 (48h, Pseudomonas radiosa)	
						0.186 (48h)	
						0.233	
						0.233	
						0.168 (Pseudomonas paucimobilia)	
						0.168 (Pseudomonas paucimobilia)	
CLIN [Rev 3.90] Ochrobactrum							
						0.233	
						0.233	
						0.168 (Pseudomonas paucimobilia)	
						0.168 (Pseudomonas paucimobilia)	

Fig. 5

RT	Area	Ar/Rt Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.665	239780224	0.032	7.033	SOLVENT PEAK		< min rt	
1.947	544	0.028	7.566			< min rt	
2.094	560	0.027	7.844			< min rt	
4.369	16792	0.034	11.420	10:0 3OH	4.14	ECL deviates -0.003	
4.870	2080	0.041	11.943				
4.925	6464	0.038	12.000	12:0	1.56	ECL deviates -0.000	Reference 0.000
5.235	1624	0.053	12.259				
6.370	23080	0.041	13.176	12:0 2OH	5.34	ECL deviates -0.002	
6.764	15360	0.041	13.455	12:0 3OH	3.52	ECL deviates -0.000	
7.535	3656	0.043	14.000	14:0	0.82	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
10.509	109552	0.048	15.819	Sum In Feature 4	23.46	ECL deviates 0.002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10.817	102120	0.048	16.001	16:0	21.78	ECL deviates 0.001	Reference 0.001
11.045	10608	0.053	16.130	15:0 ISO 3OH	2.26	ECL deviates -0.005	
11.330	10112	0.049	16.292				
12.376	6256	0.052	16.888	17:0 CYCLO	1.31	ECL deviates -0.000	Reference -0.000
14.045	169864	0.051	17.825	Sum In Feature 7	35.07	ECL deviates 0.000	18:1 w9c/w12t/w7c
14.355	1488	0.054	17.999	18:0	0.31	ECL deviates -0.001	Reference 0.000
14.603	16104	0.057	18.139				
15.951	2192	0.061	18.901	19:0 CYCLO w8c	0.45	ECL deviates 0.001	Reference 0.002
*****	109552			SUMMED FEATURE 4	23.46	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c
*****	169864			SUMMED FEATURE 7	35.07	18:1 w7c/w9t/w12t	18:1 w9c/w12t/w7c
*****						18:1 w12t/w9t/w7c	

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
39780224	497352	467432	93.98	443648	6	0.002	0.001

TSBA [Rev 3.90]	Pseudomonas	0.457
	P. aeruginosa	0.457
CLIN [Rev 3.90]	Pseudomonas	0.226
	P. aeruginosa*	0.226
	P. stutzeri	0.147
	P. putida	0.119
	P. p. biotype A*	0.119
	Chryseomonas	0.153 (*Pseudomonas V81*)
	C. luteola	0.153 (*Pseudomonas V81*)

Fig. 6

[illegible]

9/10

Fig. 7

RT	Area	Ar/Ht Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.664	241080192	0.032	7.031	SOLVENT PEAK	< min rt		
10.814	8176	0.048	0.946	16:0	6.88	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
14.041	102160	0.052	0.916	Sum In Feature 7	83.22	ECL deviates -0.001	18:1 w9c/w12t/w7c
14.352	2552	0.054	0.914	17:999	2.07	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
14.608	1544	0.077	18.143				
15.949	9720	0.053	0.906	18:901	7.83	ECL deviates 0.001	Reference 0.001
*****	102160			SUMMED FEATURE 7	83.22	18:1 w7c/w9t/w12t	18:1 w9c/w12t/w7c
*****						18:1 w12t/w9c/w7c	
Solvent Ar Total Area Named Area % Named Total Amnt Nbr Ref ECL Deviation Ref ECL Shift							
241080192	124152	122608	98.76	112432	3	0.001	0.001
TSBA [Rev 3.90] Ochrobactrum							
O. anthropi							
Bradyrhizobium							
B. japonicum							
B. j. GC subgroup A							
Xanthobacter							
X. agilis							
X. flavus							
CLIN [Rev 3.90] Ochrobactrum							
O. anthropi*							

0.620 (Achromobacter Vd, CDC gr up Vd)
0.620 (Achromobacter Vd, CDC group Vd)
0.587 (4D, Rhiz X medium)
0.587 (4D, Rhiz X medium)
0.587 (4D, Rhiz X medium)
0.500
0.500
0.254
0.548
0.548

10/10

Fig. 8

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.664	248735360	0.031	. . .	7.031	SOLVENT PEAK	< min	rt	
1.770	6064	0.024	. . .	7.231	< min	rt	
1.862	2552	0.027	. . .	7.405	< min	rt	
1.945	1096	0.034	. . .	7.562	< min	rt	
10.815	2752	0.046	0.946	15.999	16:0	2.81	ECL deviates -0.001	Reference -0.001
11.327	1448	0.054	. . .	16.291			
12.575	1712	0.058	0.927	17.002	17:0	1.72	ECL deviates 0.002	Reference 0.001
13.500	968	0.059	0.920	17.521	16:0 3OH	0.96	ECL deviates 0.001	
14.041	90456	0.051	0.916	17.825	Sum In Feature 7 . .	89.56	ECL deviates -0.000	18:1 w9c/w12t/w7c
14.352	3920	0.049	0.914	17.999	18:0	3.87	ECL deviates -0.001	Reference -0.002
14.499	760	0.044	. . .	18.082			
14.613	49552	0.055	. . .	18.147			
17.575	1096	0.057	0.902	19.834	20:1 w9t	1.07	ECL deviates -0.001	
*****	90456	SUMMED FEATURE 7 . .	89.56	18:1 w7c/w9t/w12t	18:1 w9c/w12t/w7c
*****	18:1 w12t/w9t/w7c	

olvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amt	Mbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
248735360	152664	100904	66.10	92494	3	0.001	0.001

QUESTION ANALYSIS: PERCENT AREA NAMED IS LESS THAN 85. CHECK FOR CONTAMINATION.

TSBA [Rev 3.90]	Methylobacterium	0.782 (48h, Pseudomonas radiora)
	M. radiotolerans	0.782 (48h, Pseudomonas radiora)
	M. mesophilicum*	0.708 (48h, Pseudomonas mesophilica)
	M. zatmanii	0.674 (48h)
	Rhodobacter	0.657
	R. sphaeroides	0.657
	R. capsulatus	0.454
	Xanthobacter	0.647
	X. flavus	0.647
CLIN [Rev 3.90]	Methylobacterium	0.512
	M. mesophilicum	0.512
	Ochrobactrum	0.403
	O. anthropi*	0.403

Vedenpuhdistusmenetelmä, siihen soveltuvia bakteereja ja niiden käyttö

Keksinnön ala

5 Keksintö kohdistuu menetelmään jäteveden puhdistamiseksi biologisesti sekä menetelmään soveltuviin bakteereihin ja bakteerisekapopulaatioon sekä niiden käyttöön. Keksintö koskee edelleen bioreaktoria, joka sisältää mainittuja bakteereja tai sekapopulaatiota.

Keksinnön tausta

10 Vettä voidaan perinteisesti puhdistaa sekä fysikaalisin että kemiallisin keinoin, esimerkiksi sedimentaatiolla, suodatuksella tai flokkauksella WO94/5866 ja WO88/5334. Orgaanisten yhdisteiden ja muiden vaikeasti puhdistettavien yhdisteiden poistamiseksi on lisäksi edullista käyttää ns. biologista puhdistusta, jossa puhdistettava vesi saatetaan kosketuksiin saasteita hajottavien mikro-organismien kanssa. Biologiset vedenpuhdistusmenetelmät sovel-
15 tuvat käytettäväksi sekä tavanomaisissa vedenpuhdistuslaitoksissa että teollisuusjätevesien puhdistuslaitoksissa. Biologista veden puhdistusta on myös kokeiltu järjestelmissä, joissa vesi kierrätetään (FI 964141). Biologista veden puhdistusta kaivataan myös esimerkiksi kaatopaikan suotoveden puhdistami-
20 seksi, ennenkuin suotovesi lasketaan luontoon.

Biologinen puhdistusmenetelmä on kuitenkin vaikeammin hallittavissa kuin kemialliset tai fysikaaliset puhdistusmenetelmät. Ensinnäkin pitää löytää sellaiset mikro-organismit, jotka hajottavat kyseiset saasteet. Lisäksi mikro-organismien pitää olla sellaiset, jotka pysyvät hyvin hengissä ja pystyvät
25 lisääntymään vedenpuhdistuksessa vallitsevissa olosuhteissa. Toisin sanoen vedenpuhdistukseen käytettävien mikro-organismien pitää olla kilpailukykyisiä, niin etteivät vedessä olevat muut organismit pääse vallalle. Lisäksi veden puhdistukseen käytettävät mikro-organismit eivät saa olla herkkiä ympäristön muutoksille, jotka usein esiintyvät vedenpuhdistusprosesseissa, kun kuormitus
30 vaihtelee.

Vedenpuhdistukseen on käytetty hyvin monenlaisia mikro-organismeja, joista tässä mainittakoon esim. bakteerit ja alkueläimet, kuten ripsieläimet. Bakteereista on käytetty paljon *Pseudomas*-sukuun kuuluvia lajeja, mutta myös esim. *Alcaligenes*, *Acinetobacter*- tai *Rhodococcus*-suvun jä-
35 seniä. Yleensä käytetään runsaasti eri mikro-organismeja sisältäviä sekapopulaatioita, joista osa on tunnistettu ja osa ei. Aerobiset tai fakultatiiviset mik-

ro-organismit soveltuvat parhaiten veden puhdistukseen, jolloin puhdistettavaan veteen on tarkoituksenmukaista pumpata ilmaa biologisen puhdistuksen tehostamiseksi.

Viljeltäessä mikro-organismeja viljelyalusta täytyy normaalisti steriloida, jotta viljelmä ei kontaminoituisi ulkopuolisilla organismeilla. Koska jäteveden puhdistuksessa yleensä käsitellään suuria tilavuuksia vettä, niin biologiseen puhdistukseen tarvittava biomassan määrä on myös suuri. Tällaisen biomassan tuottaminen steriileissä olosuhteissa on sekä vaivalloista että kallista ja siksi olisi erittäin toivottavaa, jos biomassaa voitaisiin tuottaa ei-steriileissä olosuhteissa ilman kontaminaatiovaaraa. Esillä oleva keksintö tarjoaa nyt uuden fermentointiteknologian, jossa ei tarvitse steriloida. Tämä on mahdollista, kun käyttää menetelmään erityisen sopivia mikro-organismeja, joille syötetään niille sopivia ravinteita.

15 Yhteenveto keksinnöstä

Esillä oleva keksintö kohdistuu mikro-organismeihin, jotka soveltuvat yllättävän hyvin jäteveden biologiseen puhdistukseen. Nämä mikro-organismit täyttävät erityisen hyvin edellä mainitut veden biologiseen puhdistukseen soveltuville mikro-organismeille asetetut vaatimukset. Keksinnön mukaiset mikro-organismit ovat lisäksi niin spesifisiä, että niiden biomassaa voidaan tuottaa ei-steriilisti käyttämällä kasvualustaa, jossa muut mikro-organismit eivät pysty kilpailemaan. Tämä mahdollistaa huomattavia säästöjä biologisen vedenpuhdistusprosessin kustannuksissa ja energiankulutuksessa ja saavutetut puhdistustulokset ovat erinomaiset. Keksinnön mukaisesti puhdistetut vedet kelpaavat jopa kierrätykseen.

Keksinnön kohteena ovat näin ollen bakteerit *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero DSM 12560 ja sen jälkeläiset, *Pseudomonas* sp. DT-2, sittemmin tunnistettu *Pseudomonas azelaica*:ksi, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja sen jälkeläiset sekä entinen *Pseudomonas* sp. nykyinen *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero DSM 12562 ja sen jälkeläiset. Myöhemmät 16S rDNA analyysit ovat osoittaneet, että tämä bakteeri muistuttaa eniten *Rhizobium*-suvun jäseniä, mistä syystä se tästä lähtien lasketaan niihin. Keksintö koskee myös seuraavia vedenpuhdistusta edesauttavia bakteerikantoja: *Pseudomonas azelaica* DT-6, jolla on talletusnumero DSM 13516, *Azospirillum* sp. DT-10, jolla on talletusnumero DSM 13517, *Ancylobacter aquaticus* DT-12, jolla on talletusnumero DSM 13518 ja *Xanthobacter* sp. DT-13, jolla on

talletusnumero DSM 13519 ja niiden jälkeläisiä. DSM 12560 - 12562 on talletettu talletuslaitokseen Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 1.12.1998 ja DSM 13516 - 13519 on talletettu 29.5. 2000.

5 Keksinnön kohteena on edelleen bakteerisekapopulaatio, jolle on tunnusomaista, että se sisältää bakteerin *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero DSM 12560, *Pseudomonas azelaica* DT-2, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja/tai *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero DSM 12562 ja niiden jälkeläiset.

10 Lisäksi keksintö kohdistuu edellä mainittujen bakteerien tai bakteerisekapopulaatioiden käyttöön jäteveden puhdistuksessa sekä menetelmään jäteveden puhdistamiseksi, jolle on tunnusomaista, että vesi puhdistetaan biologisesti mikro-organismeilla, jotka kuuluvat ryhmään *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero DSM 12560, *Pseudomonas azelaica* DT-2, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero DSM
15 12562 ja niiden jälkeläiset.

Keksinnön kohteena on edelleen bioreaktori, jolle on tunnusomaista, että se sisältää mikro-organismeja, jotka kuuluvat ryhmään *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero DSM 12560, *Pseudomonas azelaica* DT-2, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero
20 DSM 12562 ja niiden jälkeläiset. Bioreaktori on reaktori, jossa biologinen puhdistusreaktio suoritetaan.

Piirustukset

25 Kuviossa 1 on esitetty kaavakuviota suotoveden puhdistusjärjestelmästä.

Kuviossa 2a on esitetty bakteerikannan DT-1 rasvahappoprofiili.
Kuviossa 2b on bakteerikannan DT-1 rasvahappoanalyysin tuloste.
Kuviossa 3a on esitetty bakteerikannan DT-2 rasvahappoprofiili.
Kuviossa 3b on bakteerikannan DT-2 rasvahappoanalyysin tuloste.
30 Kuviossa 4 on bakteerikannan DT-5 rasvahappoanalyysin tuloste.
Kuviossa 5 on bakteerikannan DT-6 rasvahappoanalyysin tuloste.
Kuviossa 6 on bakteerikannan DT-10 rasvahappoanalyysin tuloste.
Kuviossa 7 on bakteerikannan DT-12 rasvahappoanalyysin tuloste.
Kuviossa 8 on bakteerikannan DT-13 rasvahappoanalyysin tuloste.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Teollisuuslaitoksen jätevedestä rikastettiin saippuaseoksella kasvavia mikro-organismeja, jotka sitten adaptoitiin viljelemällä niitä bioreaktorissa, joka sisälsi kaatopaikan jätevettä. Näin saatiin eristettyä kolme bakteerikantaa, jotka olivat ylivoimaiset muihin nähden. Mainitut bakteerikannat ovat *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero DSM 12560, *Pseudomonas azelaica* DT-2, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero DSM 12562. Nämä bakteerit voidaan kasvattaa kraanavedellä, joka sisältää noin 1 - 4 g/l saippuaa. Hyvin harva mikro-organismi pystyy aktiivisesti kasvamaan tällaisissa olosuhteissa, ja siksi tätä alustaa ei tarvitse steriloida, kun tuotetaan mainitun kolmen bakteerin biomassaa. Kannat kestävät jopa noin 40 g/l saippuaa. Parhaiten ne kasvavat saippuapitoisuudessa noin 0,3 - 0,5 g/l.

Sen lisäksi, että kyseiset bakteerikannat pystyvät kasvamaan alustalla, jolla useimmat muut bakteerit eivät pysty lisääntymään, niin ne ovat erityisen tehokkaita poistamaan jäteveden orgaanista kuormaa. Tämä mitataan yleensä kokonais-COD:na, mikä tarkoittaa kokonaiskemiallista hapenkulutusta (mg O₂/l). Eristetyt bakteerikannat pystyvät erityisesti hajottamaan vaikeasti hajoavia yhdisteitä, kuten kloorifenoleja, polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä (PAH-yhdisteitä) ja öljyjä. Ne poistavat myös raskasmetalleja. Keksinnön suo-

japiiriin sisältyvät myös mainittujen kantojen jälkeläiset, joilla tarkoitetaan mainittujen kantojen jälkeläiset, joilla on oleellisesti sama jäteveden puhdistus-

kapasiteetti kuin talletetuilla kannoilla.

Bakteereilla *Bacillus* sp. DT-1, *Pseudomonas azelaica* DT-2 ja *Rhizobium* sp. DT-5 on edelleen taipumusta flokkaantua, jolloin ne muodostavat ns. bioverkon, joka sisältää mikro-organismeista ja muista partikkeleita koostuvia kokkareita, ja joka edesauttaa puhdistusta.

E erityisen hyvät jäteveden puhdistustulokset saadaan, kun veden biologiseen puhdistukseen käytetään bakteerisekapopulaatiota, joka sisältää yhtä tai useampaa bakteeria, jotka valitaan ryhmästä, joka koostuu bakteereista *Bacillus* sp. DT-1, *Pseudomonas azelaica* DT-2 ja *Rhizobium* sp. DT-5, ja niiden jälkeläisistä. Parhaimpiin puhdistustuloksiin päästään kun käytetään sekapopulaatiota, joka käsittää kaikki kolme bakteerikantaa ja/tai niiden jälkeläisiä. Näiden kolmen kannan lisäksi bakteerisekapopulaatio voi vielä sisältää muita mikro-organismikantoja, jotka ovat hyödyllisiä vedenpuhdistuksessa, ja joilla on myönteinen yhteisvaikutus puhdistustehoon.

Parhaimmat puhdistustulokset saadaan kun mikro-organismikantoja DT-1, DT-2 ja/tai DT-5 käytetään yhdessä yhden tai useamman bakteerikannan kanssa ryhmästä *Pseudomonas azelaica* DT-6, jolla on talletusnumero DSM 13516, *Azospirillum* sp. DT-10, jolla on talletusnumero DSM 13517, *Ancyllobacter aquaticus* DT-12, jolla on talletusnumero DSM 13518 ja *Xanthobacter* sp. DT-13, jolla on talletusnumero DSM 13519 ja niiden jälkeläiset. Mainitut neljä kantaa eristettiin saippuaseosta sisältävän veden käsittelyyn tarkoitetun neljän kaskadin bioreaktorin viimeisestä yksiköstä saadusta biofilmistä. Niitä voidaan kasvattaa samalla kasvatusalustalla ja samoissa olosuhteissa kuin kantoja DT-1, DT-2 ja DT-5. DT-6, DT-10, DT-12 ja DT-13 parantavat biofilmin immobilisoitumisominaisuuksia tukimatriiseihin, kun niitä sekoitetaan kantoihin DT-1, DT-2 ja DT-5. Kantojen yhdistäminen parantaa myös jäteveden käsittelyprosessia muodostuneen biofilmin lisääntyneen sietokyvyn johdosta myrkyllisiä aineita vastaan.

Bacillus sp. DT-1 on noin 1,0-1,2 μm leveä ja 3,0-6,0 μm pitkä sauva. 16S rDNA:n osittainen sekvensointi osoittaa 99,3-%:ista samankaltaisuutta *B. cereuksen* ja 100-%:sta samankaltaisuutta *B. thuringiensisin* kanssa. Identifiointikokeissa DT-1 reagoi alla kuvatulla tavalla:

Anaerobinen kasvu	+
VP-reaktio	+
pH VP-liemessä	4,8
Kasvu väliaineen pH:ssa 5,7	+
2% NaCl	+
5%	+
7%	-
10%	-
Lysotsyyliliemi	+
Muodostaa happoa	
L-arabinoosi	-
D-ksyloosi	-
D-mannitoli	-
D-fruktoosi	+
Lesitinaasi	+
Hydrolysoi:	
Kaseiinia	+
Tween 80:tä	heikko
Eskuliinia	+
Propionaatin käyttö	-
Indolireaktio	-
Fenyyialaniinideaminaasi	+
Hemolyysi	+
Kasvu penisilliinissä 900U/ml	+

- 5 *Pseudomonas azelaica* DT-2 on 0,5-0,7 µm leveä ja 1,5-3,0 µm pitkä sauva, jolla on 1-3 polaarista flagellaa ja jolta puuttuu fluoresoivat pigmentit. 16S rDNA:n osittainen sekvensointi on 99,8-%:isesti samankaltainen kuin *Ps. azelaican*. Se reagoi seuraavasti:

Lyysi 3-%:isella KOH:lla	+
Aminopeptidaasi (Cerny)	+
Lesitinaasi	-
Käyttää:	
Arabinoosia	-
Adipaattia	+
Mannitolia	-
Glukonaattia	+
Kapraattia	+

Rhizobium sp. DT-5 on 0,5-0,7 µm leveä ja 1,5-3,0 µm pitkä sauva.

- 5 Osittainen 16S rDNA:n sekvensointi osoittaa 98,6-%:isen samankaltaisuuden *R. giardiniin* ja 98,6-%:isen samankaltaisuuden *Phyllobacterium myrsinacea-rumin* kanssa. Fysiologiset koetulokset esitetään jäljempänä. Ne eivät varmista yhtäkään näistä suvuista.

Lyysi 3-%:isella KOH:lla	+
Aminopeptidaasi (Cerny)	+
Anaerobinen kasvu	-
Simmons-sitraatti	+
Käyttää:	
Arabinoosia	+
Mannoosia	+
Mannitolia	+
Adipaattia	-

10

Bakteerikantojen DT-1, DT-2 ja DT-5 muut morfologiset, fysiologiset ja biokemialliset ominaisuudet on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1. Kantojen morfologiset, fysiologiset ja biokemialliset ominaisuudet

Ominaisuus	Kannan reaktio		
	DT-1	DT-2	DT-5
Solumorfologia	Suora tai hieman käyrä sauva	Suora sauva	Sauva
Liikkuvuus	+	+	+
Endosporien muodostus	+	-	-
Itiömuoto	E	-	-
Itiön sijainti	T	-	-
Paisunut sporangium	-	-	-
Gram-värijäys	P	N	N
Katalaasi	+	+	+
Oksidaasi	+	+	+
Nitraatin pelkistys nitriitiksi	+	+	-
Denitrifikaatio	-	+	-
Arginiinidihydrolaasi	+	+	-
Hydrolyysi:			
- tärkkelys	+	-	-
- gelatiini	+	-	-
- asetamidi	-	-	+
Ureaasi	-	-	+
Aromaattisen renkaan pilkkominen	-	Orto	-
Kasvu lämpötilassa:			
35 °C	+	+	+
39 °C	+	+	-
40 °C	+	-	-
41 °C	+	-	-
43 °C	-	-	-

Käyttää:			
Asetaattia	+	+	+
D-alaniinia	-	+	-
L-alaniinia	-	+	+
β-alaniinia	-	+	-
L-arginiinia	+	+	+
L-asparagiinia	±	+	±
L-aspartaattia	±	+	-
Sitraattia	+	+	-
L-kysteiiniä	-	-	+
L-kystiiniä	-	-	-
Etanolia	-	+	-
D-glukoosia	+	+	+
Glutamaattia	+	+	±
Glyserolia	+	-	-
Glysiiniä	-	-	-
L-histidiiniä	-	+	+
p-hydroksibensoaattia	-	+	-
meso-inositolia	-	-	+
Laktoosia	-	-	-
L-leusiinia	±	+	+
L-lysiinia	±	+	-
Malaattia	+	+	-
Malonaattia	+	-	-
Metanolia	-	-	-
L-metioniinia	-	-	-
L-proliinia	-	+	+
DL-seriiniä	+	-	-
Sukkinaattia	+	+	+
Sakkaroosia	±	-	+
DL-treoniinia	-	-	-
D-trehaloosia	+	-	+
DL-tryptofaania	±	-	-
L-tyrosiinia	-	+	±

P = positiivinen
N = negatiivinen
E = soikionmuotoinen
T = terminaalinen

5

Lisäksi bakteerikantojen DT-1, DT-2 ja DT-5 rasvahappoprofiilit määritettiin ja ne on esitetty kuvioissa 2 - 4. Bakteereja kasvatettiin 24 h, 28 °C:ssa tryptisellä soijaliemiagarilla ja tehtiin metyyliestereitä koko solun rasvahappoanalyysiä varten, kuten on kuvattu julkaisussa Väisänen, O.M., E-L
10 Nurmiaho-Lassila, S.A. Marmo ja M.S: Salkinoja-Salonen. 1994. Structure and composition of biological slimes on paper and board machines. Appl. Environ. Microbiol. 60:641-653. Käytettiin aerobista TSBA-kirjastoa versio 3.9 (MIDI Inc., Newark, DE, USA). Kuvioden 2a ja 3a x-akselilla on retentioaika (minuuteissa) ja y-akselilla on piikin intensiteetti. Rasvahappoanalyysien vas-
15 taavat tulosteet on esitetty kuvioissa 2b, 3b ja 4. DT-1:n rasvahappoprofiili on tyypillinen *B. cereus* -ryhmälle. DT-2:n profiili on tyypillinen pseudomonaksien RNA ryhmä I:lle ja DT-5:n profiili viittaa *Rhizobium*- ryhmään.

Pseudomonas azelaica DT-6 on 0,5-0,7 µm leveä ja 1,5-3,0 µm pitkä gram-negatiivinen, liikkuva sauva, jolla on 1-3 polaarista flagellaa ja jolta
20 puuttuvat fluoresoivat pigmentit. Sen rasvahappoanalyysikuvio (kuvio 5) on tyypillinen pseudomonaksien RNA ryhmä I:lle. 16S rDNA:n osittainen sekvensointi osoittaa 99,8-%:ista samankaltaisuutta *Ps. azelaican* kanssa. DT-6:llä on seuraavat fysiologiset reaktiot:

Lyysi 3-%:isella KOH:lla	+
Aminopeptidaasi (Cerny)	+
Oksidaasi	+
Katalaasi	+
ADH	+
NO ₂ :ta NO ₃ :sta	+
Denitrifikaatio	weak
Ureaasi	-
Gelatiinin hydrolyysi	-
Lesitinaasi	-
Käyttää (API 20NE):	
Glukoosia	+
Arabinoosia	-
Adipaattia	+
Malaattia	+
Mannitolia	-
Glukonaattia	+
Kapraattia	+

- Azospirillum* sp. DT-10 on 0,8-1,2 µm leveä ja 2,0-4,0 µm pitkä gram-negatiivinen sauva. Sen rasvahappoanalyysikuvio (kuvio 6) on tyypillinen proteobakteerien α -alaryhmälle ja viittaa *Azospirillum*-sukuun. 16S rDNA:n osittainen sekvensointi osoittaa 92 - 97,4-%:isia samankaltaisuuksia *Azospirillum*-suvun eri jäsenten kanssa. Korkein samankaltaisuus 97,4% havaittiin *Azospirillum lipoferumin* kanssa. DT-10:n fysiologiset reaktiot on esitetty jäljempänä. Ne viittaavat *Azospirillum*-sukuun mutteivät ole tyypillisiä *A. lipoferumille*. DT-10 on mahdollisesti tämän suvun uusi kanta.

Lyysi 3-%:isella KOH:lla	heikko
Aminopeptidaasi (Cerny)	+
Oksidaasi	+
Katalaasi	+
NO ₂ :ta NO ₃ :sta	+
Ureaasi	+
ADH	-
Hydrolysoi:	
Gelatiinia	-
Eskuliinia	-
Käyttää (ainoana hiililähteenä):	
Glukoosia	-
Arabinoosia	-
Adipaattia	-
Malaattia	+
Mannitolia	-
Fenyyliasetaattia	-
Sitraattia	-
Kapraattia	-
Glukonaattia	-
Maltoosia	-
N-asetyyli-glukosamiinia	-
α-ketoglutaraattia	+
Sakkarosia	-
m-inositolia	-
D-fruktoosia	+
Ramnoosia	-
Arabitolia	-
Riboosia	-
Kasvu 41 °C:ssa	-
3 % NaCl:a läsnä	-

Ancylobacter aquaticus DT-12 on gram-negatiivinen käyrä sauva,
5 joka on 0,5-0,7 µm leveä ja 1,5-2,0 µm pitkä. 16S rDNA:n osittainen sekvenssi

osoittaa 98,8-%:ista samankaltaisuutta *Ancylobacter aquaticuksen* kanssa. *Thiobacillus novellus* osoittaa 97,8-%:ista samankaltaisuutta. Rasvahapot (kuvio 7) viittaa α -proteobakteereihin. Alla esitetyt fysiologiset kokeet identifioivat selvästi *Ancylobacter aquaticus* -lajin.

5

Lyysi 3-%:isella KOH:lla	heikko
Aminopeptidaasi (Cerny)	+
Oksidaasi	+
Katalaasi	+
ADH	-
Ureaasi	-
Hydrolysoi:	
Gelatiinia	-
Eskuliinia	+
NO ₂ :ta NO ₃ :sta	-
Denitrifikaatio (24 h)	-
Käyttää:	
Glukoosia	+ (heikko)
Sitraattia	+
Arabinoosia	+
Mannoosia	-
Mannitolia	+
Maltoosia	-
N-asetyyli-glukosamiinia	-
Glukonaattia	-
Malaattia	+
Fenyyliasetaatia	-
Metanolia	+
Formaattia	heikko

Xanthobacter sp. DT-13 on epäsäännöllinen, liikkuva gram-negatiivinen sauva, jonka leveys on 0,8-1,0 μm ja pituus 1,5-3,0 μm . 16S rDNA:n osittainen sekvensointi osoittaa 98,5 - 99,3-%:isia samankaltaisuuksia

10 *Xanthobacter*-suvun eri jäsenten kanssa. *X. falvus* osoittaa suurinta samankaltaisuutta (99,3%). Rasvahappoprofiili on tyypillinen α -proteobakteerien alaluokalle. Fysiologiset kokeet eivät kykene luotettavasti erottamaan tämän su-

vun lajien välillä (ts. pigmentin muodostusta ei havaita, ei liman muodostusta jne.). Fysiologiset tiedot ovat seuraavat:

Lyysi 3-%:isella KOH:lla	+
Aminopeptidaasi (Cerny)	+
Oksidaasi	+
Katalaasi	+
ADH	-
Ureaasi (24 h)	-
Hydrolysoi:	
Gelatiinia	-
Eskuliinia	-
NO ₃ :n käyttö	-
Käyttää:	
Fenyylasettaattia	-
Sitraattia	-
Malaattia	+
Arabinoosia	-
Mannoosia	-
Mannitolia	-
Kapraattia	-
Maltoosia	-
Adipaattia	+
Malonaattia	+
Metanolia	-
m-inositolia	-
m-tartraattia	+
D-glukonaattia	+
Fenyylialaniinia	-

5

Edellä kuvatut bakteerit soveltuvat käytettäväksi jäteveden puhdistamiseen. Tällöin bakteerit voidaan ensin kasvattaa esim. minimaalisuolaalustassa (KSN) ravistelijassa. Soijapeptonia (0,5 g/l), tryptonia (0,1 g/l), gluukoosia (0,2 g/l) ja kaliumasettaattia (0,3 g/l) voidaan halutessa lisätä. Bakteerien kasvatuslämpötila on noin 20 - 30 °C. Tästä kasvatuksesta siirrytään sitten

10

suurempaan mittakaavaan vedenpuhdistukseen tarvittavan biomassan tuottamiseksi. Tämä vaihe voidaan jo suorittaa steriloimattomissa olosuhteissa, jolloin kasvualustana voidaan käyttää kraanavettä, johon on lisätty noin 0,5 - 4 g/l saippuaa. Käytetty saippua on edullisesti seos, joka sisältää anionisia, kationisia, amfoteerisiä ja non-ionisia tensidejä. On suositeltavaa käyttää eri saippuoiden, kuten astianpesu-, huuhtelu-, pyykinpesu- ja yleispuhdistusaineiden, seosta. Bakteerit kasvatetaan pinnanalaisena viljelynä, johon pumpataan ilmaa. Biomassaa voidaan tuottaa panosviljelmänä, mutta edullisesti sitä tuotetaan jatkuvana viljelynä eli kemostaattiviljelynä. Biomassan tuottamisessa on edullista käyttää kantajaa. Tähän sopii mikä tahansa tavanomainen esimerkiksi muovinen kantaja. Saatua biomassaa siirretään sitten vedenpuhdistusreaktoriin, johon tuodaan puhdistettava vesi. Reaktorissakin käytetään bakteereille kantajaa ja mieluummin samaa kantajaa kuin biomassan tuotossa. Kantaja on edullisesti sellainen, jonka ominaistiheys on pienempi kuin 1 g/cm^3 . Yleensä kantaja pidetään paikoillaan säiliössä esimerkiksi verkon avulla ns. 'kiinnitetty kantaja', mutta joskus annetaan kantajan uida vapaasti säiliössä ns. 'uiva kantaja'.

Keksinnön mukainen menetelmä soveltuu erityisesti kaatopaikan suotoveden puhdistamiseksi, jota tässä kuvataan tarkemmin kuvioon 1 viittaten. Kaatopaikan ympärille on yleensä kaivettu oja, johon suotovesi kerätään. Suotovedellä tarkoitetaan sateen ja pohjaveden seurauksena kaatopaikalta suotautuvaa vettä. Tämä sekä pinta- että kolovettä sisältävä suotovesi johdetaan yleensä ensin säiliöön, josta se viedään puhdistusprosessin läpi ennenkuin se lasketaan ympäristöön. Edullisesti sekä syvältä että matalalta saatu suotovesi kerätään ensin tasausaltaaseen, josta se suodatetaan tuloputken 1 kautta suodoskaivoon 2, ja sieltä siirtoputken 8 kautta bioreaktoriin 3, joka sisältää kyseiset bakteerit ja kantajan 5. Bakteerit muodostavat ns. biofilmin kantajan ympärille. Kantaja bakteereineen pidetään yleensä vesipinnan alla verkon avulla. Edullisesti bioreaktorissa on yksi tai useampia väliseiniä 6, jotka on asetettu siten, että vesi pakotetaan kiertämään reaktorissa. Väliseinät voidaan esimerkiksi asentaa vastakkaisille seinille kuten kuviossa 1 on esitetty. Reaktoriin kuuluu yleensä lisäksi ilmastuslaite 9 ilman viemiseksi reaktoriin ilmastusputken 4 kautta. Lisäksi bioreaktoriin kuuluu lähtöputki 7, josta käsitelty vesi poistetaan reaktorista.

Paitsi suotoveden puhdistukseen esillä oleva keksintö sopii erinomaisesti myös esim. kotitalouksien ja teollisuuslaitosten harmaaveden puh-

distukseen. Harmaavedellä tarkoitetaan muita kuin WC:stä tulevia jätevesiä, kuten suihkuvedet, käsipesualtaiden ja pesuammeiden vedet ja pyykinpesuvedet. Keksinnön mukainen puhdistusmenetelmä sopii myös WC:n jäteveden puhdistukseen, jota kutsutaan mustaksi vedeksi. Lisäksi keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan puhdistaa pesulan ja teollisuuden jätevesiä, jotka usein sisältävät runsaasti orgaanisia jätteitä kuten öljyä, polysyklisiä aromaattisia hiilivetyjä (PAH-yhdisteitä) ja/tai raskasmetalleja. Menetelmä soveltuu myös esim. elintarviketeollisuuden jätevesien puhdistukseen ja uima-altaan veden puhdistukseen.

10

Esimerkki 1

Biomassan tuotto ja bioreaktorin käynnistys

Bacillus sp. DT-1, *Pseudomonas azelaica* DT-2 ja *Rhizobium* sp. DT-5 siirrostettiin kukin 200 ml:aan steriloitua minimaalisuola-alustaa (KSN), jonka koostumus oli seuraava (g/l tislattua vettä): $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ - 1,0, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ - 0,25, $(NH_4)_2SO_4$ - 0,1, $MgSO_4 \times 7H_2O$ - 0,04, $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ - 0,01, hiivauutetta - 0,05, pH 7,0 - 7,3, ja saippuaseosta noin 1 g/l. Saippuaseos sisälsi noin yhtä suuria määriä seuraavia pesuaineita: pyykkisuopaa, Comfort, Cleani Family -huuhteluainetta, Cleani Color, Serto Ultra, Bio Luvil, Ariel Futur, Omo Color, Tend Color, Tend Mega, Tend Total ja Eko Kompakt (yhteensä noin 1g/l). Bakteerit viljeltiin ravistelijassa (150-200 rpm), 28 °C:ssa.

Kun kasvusto oli runsasta kaikki kolme viljelmää vietiin samaan 500 litran fermenttoriin tarvittavan biomassan tuottamiseksi. Fermenttori sisälsi steriloimatonta kraanavettä ja yhteensä 4 g/l edellä mainittua saippuaseosta sekä polyeteeniä sisältävän muovisen kantoaineen, jonka ominaistiheys oli noin 0,8 g/cm³. Kantaja pidettiin nesteen pinnan alla verkon avulla. Viljelyä jatkettiin nyt epästeriileissä olosuhteissa turbiditeettiin noin 2 (600 nm) ja jatkettiin sitten kemostaattiviljelynä. Tästä fermenttorista saatu alkusiirros vietiin sitten kuvion 1 mukaiseen bioreaktoriin (6 m³) laimentaan 1:10. Bioreaktori sisälsi kunnallisen kaatopaikan suotovettä, jota oli ensin kerätty säiliöön, josta se sitten vietiin tasausaltaaseen kiintoaineksen poistamiseksi ja sitten suodoskaivoon, josta se pumpattiin bioreaktoriin. Järjestelmä toimii periaatteessa gravitaation avulla ja ainoa tarvittava pumppu on suodoskaivossa oleva uppopumppu. Bioreaktori sisälsi samaa kantajaa kuin biomassan tuottoon käytetty fermenttori. Kantaja pidettiin nestepinnan alapuolella verkon avulla. Bioreaktorin loppupäässä bakteerit flokkaantuivat Puhdistusprosessi oli jatkuva ja se toimi kapasiteetilla

noin 100 m³/vrk. Ilmaa pumpattiin niin, että käsiteltävän veden happipitoisuus oli > 7 mg/l.

Esimerkki 2

5 Suotoveden puhdistus

Esimerkin 1 mukaisesti järjestettyä bioreaktoria käytettiin kunnallisen kaatopaikan suotoveden puhdistukseen. Puhdistettavan jäteveden keskimääräinen COD oli noin 800 mg - 6 g O₂/l. Jätevesi sisälsi mm. kloorifenoleja, PAH-yhdisteitä ja öljyä. Näiden aineiden poistoa jätevedestä seurattiin. Yhdisteet määritettiin Nordtestin teknisen raportin nro 329 (hyväksytty 9603) mukaisesti kaasukromatografilla, joka oli varustettu massaselektiivisellä ilmaisimella. Tulokset on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2

15

Määrittäminen	Ennen bioreaktoria	Bioreaktorin jälkeen
COD	0,8 - 6 g/l	100-200 mg/l
kloorifenolit	> 1 mg/l	< 1 µg/l
PAH	1 mg/l	< 1 µg/l
öljy	0,2 - 1 mg/l	200 µg/l

Esimerkki 3

Kunnan jäteveden puhdistus (täydessä mittakaavassa)

Kunnallisen jätevesilaitoksen jätevettä puhdistettiin sekä laitoksen tavanomaisella tavalla että keksinnön mukaisella menetelmällä. Tavanomaisen jäteveden puhdistus suoritettiin siten, että jätevesi ensin johdettiin esiselkeytysaltaaseen kiinteiden aineiden saostamiseksi pohjaan. Esiselkeytetty vesi johdettiin sitten aerobiseen käsittelyaltaaseen, johon lisättiin ferrosulfaattia fosfaatin saostamiseksi ja polyamiinia biolietteen saostamiseksi, ja tästä vesi johdettiin vielä jälkiselkeytysaltaaseen. Keksinnön mukainen puhdistusjärjestelmä koostui viidestä säiliöstä, joiden yhteinen tilavuus oli 7,5 m³ ja jotka oli kytketty toisiinsa seuraavassa järjestyksessä: kaksi anaerobista säiliötä, johon lisättiin bakteerit DT-1, DT-2 ja DT-5 ilman kantajaa, yksi aerobinen säiliö, johon oli (verkkojen avulla) kiinnitetty kantaja, johon oli immobilisoitu bakteerit DT-1, DT-2 ja DT-5, ja kaksi saostussäiliötä. Lämpötila oli 8 - 15 °C. Virtaus-

nopeus oli 7,5 m³ jätevettä vuorokaudessa. Ilmastus tapahtui kierrättämällä vesi kantajan läpi. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

5

Parametri	Ennen käsittelyä	Tavanomaisen puhdistuksen jälkeen	Keksinnön mukaisen puhdistuksen jälkeen
BOD7 mg O ₂ /l	200-300	10-15	10-15
COD _{Cr} mg O ₂ /l	250-500	60-75	40-50
Kok. typi mg N/l	35-55	15-25	15-25
Kok. fosfori mg P/l	5-10	0,6-1,8	0,5-1,8
Fek. Streptokokit pmy/100 ml	10 ⁸	2x10 ⁴ -3x10 ⁴	2x10 ⁴ -3x10 ⁴
Termotolerantit koliformit pmy/100 ml	3x10 ⁸	2x10 ⁴ -4x10 ⁴	2x10 ⁴ -4x10 ⁴

Puhdistustulokset keksinnön mukaisella järjestelmällä olivat joko yhtä hyvät tai paremmat kuin tavanomaisella menetelmällä ja energian kulutus oli huomattavasti pienempi. Energian kulutus yhden kuutiometrin veden käsittelemiseksi oli kunnallisessa jätevesilaitoksessa 0,23 kWh ja keksinnön mukaisella menetelmällä 0,05-0,1 kWh.

10

Esimerkki 4

Kotitalouksien mustan veden puhdistus (täydessä mittakaavassa)

15

Järjestelmä koostui viidestä säiliöstä, joiden yhteinen tilavuus oli 6,5 m³ ja jotka oli kytketty toisiinsa seuraavassa järjestyksessä: kaksi anaerobista säiliötä ilman kantajaa, johon lisättiin DT-1, DT-2 ja DT-5, yksi aerobinen säiliö, johon oli kiinnitetty kantaja, johon bakteerit DT-1, DT-2 ja DT-5 oli immobilisoitu, ja kaksi saostussäiliötä. Lämpötila oli 8 - 15 °C. Virtausnopeus oli 0,5 - 5 m³ jätevettä vuorokaudessa. Ilmastus tapahtui kierrättämällä vettä kantajan läpi. Energian kulutus oli 0,05 - 0,5 kWh. Tulokset on esitetty taulukossa 4.

20

Taulukko 4

Parametri	Ennen käsittelyä	Käsittelyn jälkeen
BOD7 mg O ₂ /l	400-5500	3-20
COD _{Cr} mg O ₂ /l	400-6000	40-70
Kokonaistyyppi mg N/l	100-300	1-5
Kokonaisfosfori mg P/l	10-25	0,2-2
Fek. Streptokokit	10 ⁸ -10 ⁹	<20
pmy/100 ml		
Termotolerantit koli-	10 ⁸ -10 ⁹	<20
formit pmy/100 ml		
pH	7-8	6,5-7

5

Esimerkki 5

Saippuaa ja raskasmetalleja sisältävän teollisuusjäteveden puhdistus (laboratoriomittakaavassa)

- 10 Pinnoittavan metalliteollisuuslaitoksen jätevettä puhdistettiin järjestelmällä, jonka tehokas käsittelyosa sisälsi 6 anaerobista säiliötä ja 12 aerobista säiliötä. Kaikkiin anaerobisiin ja aerobisiin säiliöihin lisättiin bakteerit DT-1, DT-2 ja DT-5, jotka oli immobilisoitu kantajaan, joka on kiinnitetty verkkojen avulla. Kukin säiliö oli 2 l. Koko järjestelmä koostui 23 säiliöstä, joiden kokonaistilavuus oli 70 l, ja jotka oli kytketty seuraavassa järjestyksessä: 6 anaerobista säiliötä (tehokas käsittelytilavuus), 1 saostussäiliö, 6 aerobista säiliötä, (tehokas käsittelytilavuus), yksi saostussäiliö, 6 aerobista säiliötä, (tehokas käsittelytilavuus) ja 2 säiliötä kalsiumkloridi- ja natriumhydroksidikäsittelyä varten biomassan ja raskasmetallien saostamiseksi. Ennen käsittelyä alkuperäinen
- 20 jätevesi laimennettiin viisinkertaisesti harmaavedellä. Laimennuksen jälkeen lisättiin mineraalisuoloja seuraavasti: NH⁴⁺ 2-10 mg/l, NO³⁻ 5-20 mg/l, Mg²⁺ 2-10 mg/l, Ca²⁺ 0,5-2 mg/l, SO₄²⁻ 1-10 mg/l ja PO₄³⁻ 2-20 mg/l. Lämpötila oli 20 - 35 °C ja virtausnopeus 12 l vettä vuorokaudessa. Tulokset on esitetty taulukossa 5.

25

Taulukko 5

Parametri	Ennen käsittelyä	Käsittelyn jälkeen
COD _{Cr} mg O ₂ /l	19000-21000	100-400
Kokonaisfosfori mg P/l	19-25	0,3-0,7
Alumiini	5-6	0,01-0,02
Kromi	1,3-1,5	0,01-0,02
Kupari	35-40	0,03-0,1
Rauta	1-2	0,02-0,07
Lyijy	23-25	0,02-0,09
Nikkeli	2-3	0,05-0,09
Sinkki	30-60	0,003-0,007
pH	8-9	7-7,5

5 **Esimerkki 6**

Kotitalouksien harmaaveden puhdistus kierrätyskelpoiseksi (piloottimittakaava)

- Järjestelmän tehokas osa sisälsi 3 aerobista säiliötä, joiden yksittäinen tilavuus oli 0,2 m³. Koko järjestelmä koostui 6 säiliöstä, joiden kokonaistilavuus oli 2,8 m³, ja jotka oli kytketty seuraavassa järjestyksessä: yksi säiliö harmaaveden keräämiseksi, kolme aerobista säiliötä, joissa oli kiinteä kantaja, johon oli immobilisoitu bakteerit DT-1, DT-2 ja DT-5 (tehokas käsittelytilavuus), yksi aerobinen säiliö ilman kantajaa ja yksi saostussäiliö, ja sen jälkeen suodatusjärjestelmä ja UV-valokäsittelyjärjestelmä. Lämpötila oli 20 - 35 °C. Virtausnopeus oli noin 1 m³ harmaavettä vuorokaudessa. Tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6

Parametri	Ennen käsittelyä	Käsittelyn jälkeen
COD _{Cr} mg O ₂ /l	150-400	15-35
Kokonaistyyppi mg N/l	10-15	<0,5
Kokonaisfosfori mg P/l	5-10	<0,1
Koliformit pmy/100 ml	1,4-2 x 10 ⁶	0
pH	7,5-8,5	6,5-7

Esimerkki 7

Pesulan harmaaveden puhdistus kierrätyskelpoiseksi (piloottimittakaavassa)

Järjestelmän tehokas käsittelyosa sisältää 2 aerobista säiliötä tilavuudeltaan 1 m³, joissa on uiva kantaja, johon on immobilisoitu DT-1, DT-2 ja DT-5 ja 3 aerobista säiliötä tilavuudeltaan 0,2 m³, joihin on kiinnitetty kantaja, johon bakteerit DT-1, DT-2 ja DT-5 oli immobilisoitu. Koko järjestelmä koostuu 10 säiliöstä, joiden kokonaistilavuus on 23 m³, ja jotka on kytketty seuraavasti: yksi säiliö harmaaveden keräämiseksi, kaksi aerobista säiliötä, joissa on kelluva kantaja (tehokas käsittelytilavuus), yksi saostussäiliö, kolme aerobista säiliötä, joissa on kiinteä kantaja bakteereineen (tehokas käsittelytilavuus), yksi aerobinen säiliö ilman kantajaa ja kaksi saostussäiliötä. Veden lämpötila oli 20 - 35 °C, ja virtausnopeus noin 1 m³ jätevettä vuorokaudessa. Tulokset on esitetty taulukossa 7.

Taulukko 7

Parametri	Ennen käsittelyä	Käsittelyn jälkeen
COD _{Cr} mg O ₂ /l	200-450	25-35
Kokonaisfosfori mg P/l	1-2	<0,1
pH	8,5-9	7-8

Esimerkki 8

Immobilisoidun biomassan lisääntyminen

Kantojen DT-1, DT-2, DT-5, DT-6, DT-10, DT-12 ja DT-13 biomassaa tuotettiin ja immobilisoitiin kantajalle esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, ja biomassan määrä kantajalla punnittiin. Yhden kantajakiekon paino oli 72 ± 1 g. Kun DT-1, DT-2 ja DT-5 immobilisoitiin kantajalle, yhden kantajakiekon paino oli 119 ± 13 g, ts. biomassan märkäpaino oli 47 ± 11 g kiekkoa kohti. Kun kaikki seitsemän bakteerikantaa immobilisoitiin kantajalle, yhden kantajakiekon paino oli 172 ± 16 g, ts. biomassan märkäpaino oli 91 ± 16 g. Tulokset osoittavat, että DT-6, DT-10, DT-12 ja DT-13 lisäsivät immobilisoituneen biomassan noin kaksinkertaiseksi.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä jäteveden puhdistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että vesi puhdistetaan biologisesti mikro-organismeilla, jotka kuuluvat ryhmään *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero DSM 12560, *Pseudomonas azelaica* DT-2, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero DSM 12562 ja niiden jälkeläiset.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puhdistetaan suotovettä, harmaavettä, mustaa vettä, teollisuusjätevettä tai pesulan jätevettä.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että puhdistukseen tarvittava biomassa tuotetaan steriloimattomassa kasvualustassa, joka sisältää kraanavettä ja noin 0,5 - 4 g/l saippuaa.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetään sekapopulaatiota, joka sisältää kaikki kolme mainittua bakteerikantaa.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vesi puhdistetaan myös yhdellä tai useammalla mikro-organismin ryhmästä *Pseudomonas azelaica* DT-6, jolla on talletusnumero DSM 13516, *Azospirillum* sp. DT-10, jolla on talletusnumero DSM 13517, *Ancylobacter aquaticus* DT-12, jolla on talletusnumero DSM 13518 ja *Xanthobacter* sp. DT-13, jolla on talletusnumero DSM 13519 ja niiden jälkeläiset.

6. *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero DSM 12560 ja sen jälkeläiset.

7. *Pseudomonas azelaica* DT-2, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja sen jälkeläiset.

8. *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero DSM 12562 ja sen jälkeläiset.

9. *Pseudomonas azelaica* DT-6, jolla on talletusnumero DSM 13516 ja sen jälkeläiset.

10. *Azospirillum* sp. DT-10, jolla on talletusnumero DSM 13517 ja sen jälkeläiset.

11. *Ancylobacter aquaticus* DT-12, jolla on talletusnumero DSM 13518 ja sen jälkeläiset.

12. *Xanthobacter* sp. DT-13, jolla on talletusnumero DSM 13519 ja sen jälkeläiset.

13. Bakterisekapopulaatio, t u n n e t t u siitä, että se sisältää bakteerin *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero DSM 12560, *Pseudomonas azelaica* DT-2, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja/tai *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero DSM 12562 ja niiden jälkeläiset.

5 14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen bakterisekapopulaatio, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi sisältää bakteerin *Pseudomonas azelaica* DT-6, jolla on talletusnumero DSM 13516, *Azospirillum* sp. DT-10, jolla on talletusnumero DSM 13517, *Ancylobacter aquaticus* DT-12, jolla on talletusnumero DSM 13518 ja/tai *Xanthobacter* sp. DT-13, jolla on talletusnumero DSM 13519
10 ja niiden jälkeläiset.

15. Jonkin patenttivaatimuksen 6 - 14 mukaisen bakteerin tai bakterisekapopulaation käyttö jäteveden puhdistuksessa.

16. Bioreaktori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää mikro-organismeja, jotka kuuluvat ryhmään *Bacillus* sp. DT-1, jolla on talletusnumero
15 DSM 12560, *Pseudomonas azelaica* DT-2, jolla on talletusnumero DSM 12561 ja *Rhizobium* sp. DT-5, jolla on talletusnumero DSM 12562 ja niiden jälkeläiset.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen bioreaktori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kaikki kolme mainittua bakteerikantaa.

20 18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen bioreaktori, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi sisältää yhden tai useamman mikro-organismin ryhmästä *Pseudomonas azelaica* DT-6, jolla on talletusnumero DSM 13516, *Azospirillum* sp. DT-10, jolla on talletusnumero DSM 13517, *Ancylobacter aquaticus* DT-12, jolla on talletusnumero DSM 13518 ja *Xanthobacter* sp. DT-
25 13, jolla on talletusnumero DSM 13519 ja niiden jälkeläiset.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen bioreaktori, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kaikki seitsemän mainittua bakteerikantaa.

20. Patenttivaatimuksen 16 mukainen bioreaktori, t u n n e t t u siitä, että siinä on yksi tai useampia väliseiniä, jotka on asetettu siten, että vesi
30 pakotetaan kiertämään reaktorissa.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen bioreaktori, t u n n e t t u siitä, että bakteerit on immobilisoitu muoviselle kantoaineelle, jonka ominaistheys on noin 0,8 g/cm³.

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on menetelmä jäteveden puhdistamiseksi biologisesti käyttäen kolme erityisen sopivaa bakteeria: *Bacillus* sp. DT-1, *Pseudomonas azelaica*, DT-2, ja/tai *Rhizobus* sp. DT-5 tai niiden sekapopulaatioita. Keksinnön kohteena ovat edelleen kyseiset bakteerit ja niiden sekapopulaatiot ja näiden käyttö jäteveden puhdistuksessa. Keksintö koskee myös bioreaktoria, joka sisältää kyseiset bakteerit.